

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390328

研究課題名(和文)ゲノム情報に基づく肝移植C型肝炎再発に対する革新的治療戦略の構築

研究課題名(英文) Treatment strategies of recurrent hepatitis C after liver transplantation based on IL28B single nucleotide polymorphism.

研究代表者

武富 紹信 (Taketomi, Akinobu)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70363364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円、(間接経費) 4,350,000円

研究成果の概要(和文)：全国多施設から506例のC型肝炎に対する肝移植臨床データベースを収集した。IFN治療後のVR216例(64.1%)、SVR157例(38.3%)。移植後5,10年生存率はSVR例94.1%,83.0%、非SVR例79.7%,60.8%($p<0.001$)であり、SVR達成が患者生存率に大きく関与していた。

ドナーとレシピエントのIL28B遺伝子多型組み合わせを検討したところ、ドナー・レシピエントともにmajor allele群($n=110$)の場合のみSVR達成率高率(58.2%)であり、肝移植症例におけるC型肝炎治療におけるIL28B遺伝子多型の重要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：A nationwide survey of living donor liver transplantation (LDLT) for hepatitis C virus-positive recipients was performed in Japan. Of 514 recipients collected in the study, 361 patients underwent antiviral treatment after liver transplantation. VR rate was 64.1%, and SVR rate was 38.3%. The 5-yr and 10-yr cumulative patient survival with SVR (94.1% and 83.0%) were significantly superior than those without SVR (79.7% and 60.8%). Presence of the major allele (TT) in both the recipient and the donor corresponded to SVR of 58.2%. Presence of the minor allele (TG or GG) in either the recipient or the donor corresponded to SVR of 15.7%, 16.7% and 28.5%. Multivariate analysis revealed that genotype of IL28B polymorphisms in either the recipient or donor was an independent factor for achieving SVR. In conclusion, our study demonstrated that both donor and recipient IL28B genotype were strongly associated with graft survival and response to IFN/RBV therapy for LDLT recipients.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：肝移植 C型肝炎 遺伝子多型 SVR

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス(HCV)は肝硬変・肝細胞癌の主要な原因ウイルスであり、本邦には150万人以上の感染者が存在し、毎年2万数千人がHCV関連疾患で死亡している。その治療法として主にインターフェロン(IFN)とリバビリン(RBV)の併用療法行われており、ウイルス消失率は50%と改善してきた。しかし、進行した肝癌や末期肝硬変に対する治療法は肝移植に限られており、その対象疾患の内訳をみると約40%の症例がC型肝炎を原因とする肝硬変や肝細胞癌である (Former A, et al. Semin Liver Dis 2010)。

肝移植では健康な肝臓を移植するにもかかわらず HCV は全例において移植後直後から再感染し(Schiano TD, et al. Hepatology 2005)、その後も免疫抑制剤を恒常的に使用するため、急速にC型肝炎の病態が進行することが多く、他疾患による肝移植と比較しその移植後成績は不良である(Moonka D, et al. Am J Transpl 2009)。さらに肝移植後C型肝炎再発に対するIFN+RBV治療の効果は限定的でウイルス消失率は30%程度と不十分であるため新たな治療法の開発が急務である (Poordad F, et al. Hepatology 2010)。

通常のHCV陽性患者に対するIFNによる抗ウイルス治療の有効性と関わりのあるウイルス遺伝子変異として、Core領域のアミノ酸70番目およびアミノ酸91番目、NS5A領域内のInterferon Sensitivity Determining Region (ISDR: アミノ酸2209-2248)およびInterferon/Rivabirin Resistance Determining Region (IRRDR: アミノ酸2334-2379)の3領域のアミノ酸変異が報告されている(Akuta N, et al. J Med Virol 2007; Enomoto N, et al. N Engl J Med 1996)。さらに一般的な慢性肝炎においてIL28B遺伝子周辺の一塩基遺伝子変異(SNP:rs8099917)がIFN治療効果と強く相関することが報告された(Tanaka Y, et al. Nat Genet 2009)。

しかし、これらのゲノム変化と肝移植後のHCV再発に対するIFN治療感受性の関連については不明である。

2. 研究の目的

肝移植後のC型肝炎再発はレシピエントのQOLを著しく損なう病態である。移植症例の約40%がHCV関連疾患である本邦の現状を考えると、肝移植後のC型肝炎再発は克服すべき大きな医療課題のひとつである。

C型肝炎に対するIFN治療感受性を規定する因子として最近報告されたC型肝炎ウイルスゲノム変異解析および宿主IL28B周囲ゲノム一塩基置換(SNP)解析を肝移植症例に応用し、「ゲノム情報に基づく肝移植後C型肝炎再発に対する革新的治療戦略の構築」を行うことを目的として研究を計画した。

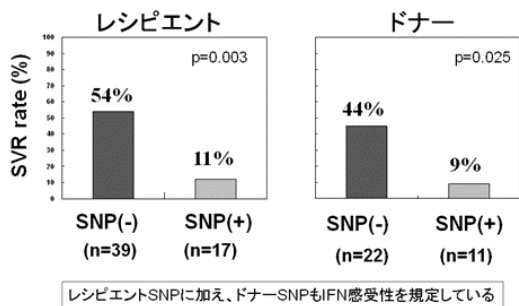
3. 研究の方法

(1)IL28Bゲノム多型およびHCVゲノム変異

とIFN治療効果の検討

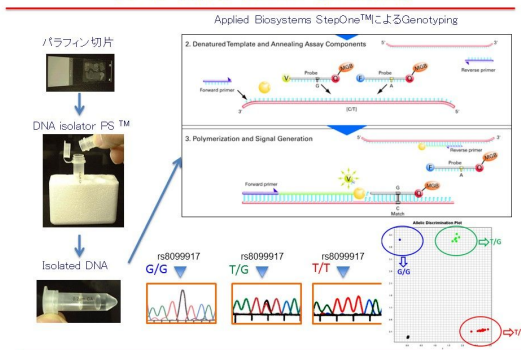
我々はこれまでに67例の肝移植症例において、DonorおよびRecipientのSNPが移植後のIFN治療効果に有意に相関することを示してきた(Fukuhara T, Taketomi A, et al. J Hepatol 2010; Fukuhara T, Taketomi A, et al. Gastroenterology 2010、下図)。この結果を臨床応用していくためには、多施設共同研究を行い、IL28B遺伝子変異解析が肝移植後IFN治療の効果予測において有用であることを確実に証明する必要がある。幸い申請者の所属する九州大学はC型肝炎に対する肝移植症例が多くまだ未解析の症例も有しているが、さらにエビデンスの高い日本発の臨床研究結果を得るためにも多施設共同研究を行い、全国的な症例の登録および遺伝子解析を行う予定である。

IL28B遺伝子多型と肝移植後IFN治療効果



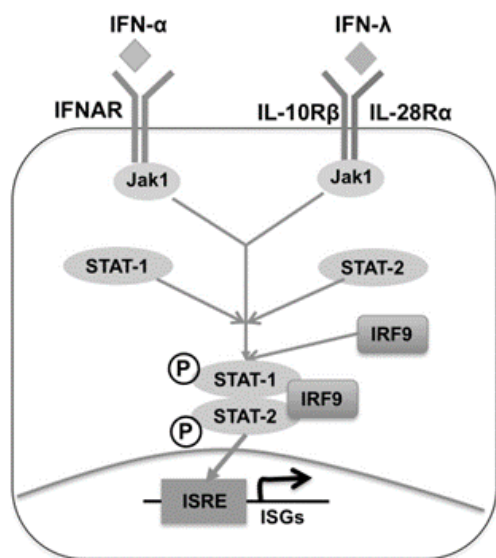
本研究では上述のごとく、全国多施設からC型肝炎肝移植患者の検体を収集し、IL28B遺伝子 genotyping 施行するため、まず、簡便かつ再現性の高い genotyping 法の確立が必要である。特に、末梢血や凍結検体が保存されていない場合にそなえてパラフィン包埋ブロックからの genomic DNA 抽出および遺伝子多型検討を可能とするため、下図のごとく Applied Biosystems 社の StepOne™ による genotyping 測定系を確立した。このシステムでは高感度蛍光プライマーを用いるため1サイクルごとに増幅をリアルタイムで測定し、指数増幅期のPCRを正確に定量することが可能となっており、IL28B遺伝子多型を短時間で正確に決定可能である。

パラフィン切片からIL28B-genotyping



(2)IL28B 遺伝子周辺の SNP と IFN 感受性が 相関するメカニズムの解明

IL28B SNP と IFN 感受性が相関する分子メカニズムについては未だ不明である。本研究では IL28B 遺伝子 SNP と interferon sensitivity gene (ISG) の発現・誘導に焦点を絞り、Replicon system および細胞培養での持続感染システムである HCVcc を用いて IL28B SNP との関連を明らかにする予定である。



(図1: IFN-αおよびIFN-λによるISGの誘導)

(3)IFN 治療感受性に対する肝組織内のキメリズムの意義の検討

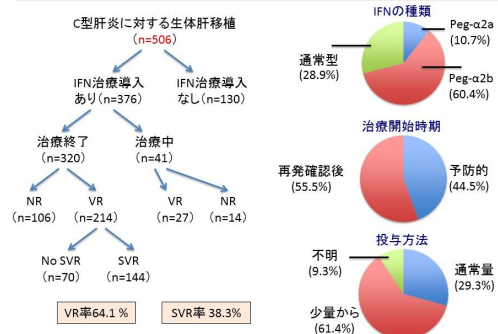
プレリミナリーな研究結果ではドナーの IL28B SNP もレシピエントと同様に IFN 感受性を規定していた。すなわち、IFN 感受性にはドナー由来の肝細胞もしくはドナー肝組織とともに持ち込まれた樹状細胞などの免疫担当細胞のキメリズムが関わっていることが予想される。移植後の HCV 排除機構においてキメリズムがどのように関わっているかを明らかにする。

4. 研究成果

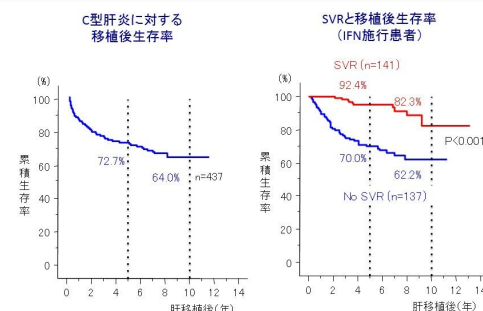
(1)IL28B ゲノム多型および HCV ゲノム変異と IFN 治療効果の検討

臨床データベースの解析から、506 例の C 型肝炎に対する生体肝移植の後、376 例に IFN 治療が導入され、216 例が VR に、157 例が SVR に至ったことが判明した。VR 率、SVR 率はそれぞれ 64.1%および 38.3%であった。また IFN 製剤は 60.4%の症例で Peg-IFNα2b、28.9%の症例で通常型 IFN、10.7%の症例で Peg-IFNα2a が使用されていた。治療開始時期および治療量の設定は施設によりそれぞれであった。C 型肝炎に対する移植後生存率は、5 年および 10 年後で SVR 例ではそれぞれ 94.1%および 83.0%、非 SVR 例でそれぞれ 79.7%および 60.8% (p<0.001) であり、SVR が患者生存率に大きく関わっていることが判明した(右上図)。

肝移植後C型肝炎再発に対する治療

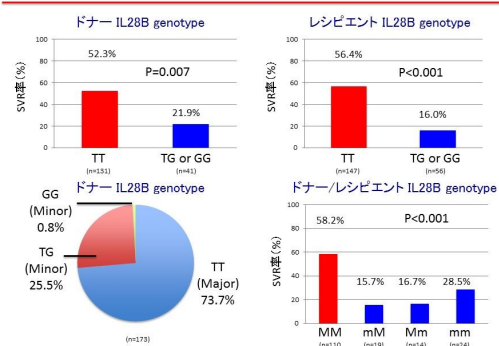


肝移植後C型肝炎再発に対する治療



IL28B 遺伝子多型を検討したレシピエントは 203 例あり、TT major allele は 147 例 (72.4%)、TG もしくは GG minor allele は 56 例 27.6%であった。TT(major)群の SVR 率は 56.4%であり、TG/GG(minor)群の 16.0%に比較し有意に効率であった。一方ドナー172 例中 TT major 群は 131 例(76.2%)、TG/GG minor 群は 41 例(23.8%)であった。SVR 率は major 群 52.3%、minor 群 21.9%とドナーの遺伝子多型でも major allele 群の SVR 達成率は有意に高値であった。さらに、ドナーとレシピエントの多型組み合わせによる SVR 達成率を検討したところ、ドナーmajor・レシピエント major 群(n=110)では SVR58.2%であったが、minor/major, major/minor, minor/minor の各 SVR 達成率は 15.7%, 16.7%, 28.5%であり、ドナーもしくはレシピエントのいずれも TT major allele の場合のみ SVR 達成率が高率であることが判明した(下図)。

IL28B-SNPとSVRの関係



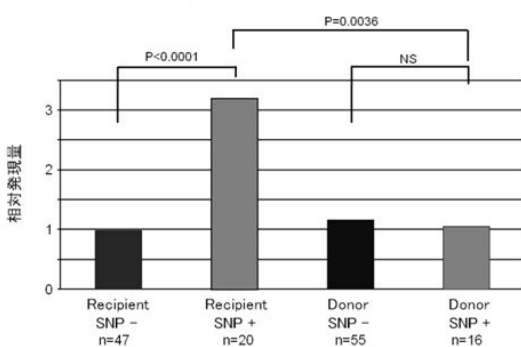
生体肝移植後の胆汁鬱滞性肝炎は非常に重篤な病態であり、その死亡率は約 60-70%といわれている。九州大学における肝移植後胆汁鬱滞性肝炎に於いて、HCVRNA が 2 週間で 7.2logIU/ml に増加することがその発症のリスクファクターであり、同疾患では HCVRNA の genetic distance が極めて小さくなっていることが判明した。また肝移植後胆汁鬱滞性肝炎の病理学的特徴は肝細胞の領域を選ばないバルーニングであることが明らかとなった。

最後に新規薬剤である Direct acting agent (Telaprevir) を用いた治療を 11 例に導入した。治療効果は激烈であり、RVR が 27.3%であったものの EVR および SVR はが 90.9%であった。ただし一例に治療 9 週で T54A の mutation が出現し viral breakthrough を発症した。しかし興味深いことにこの mutated virus は薬剤中止後時間経過とともに消失していった。一方、高度貧血と腎機能障害が Telaprevir を用いた治療の問題点であった。

(2)IL28B 遺伝子周辺の SNP と IFN 感受性が関連するメカニズムの解明

IFN- は ISG を誘導するサイトカインであり、IL28B の SNP と IFN 感受性の相関の間に ISGs の誘導が関わっている可能性が高い。移植前後、さらに移植後 IFN+RBV 治療中の生検肝組織を材料とし、IFN によって強く誘導される ISG15 や抗ウイルス活性を有する PKR、OAS mRNA 変化を定量する。これら ISG 遺伝子群の変化とドナー、レシピエントの IL-28B 周辺 SNP、さらには HCV ゲノム変異などとの関連を検討することにより、移植前後の抗ウイルス免疫動態を検討した。これまでに ISG15mRNA 発現量を定量的 RT-PCR で検討したが、レシピエントでは SNP の有無と相関していたが、ドナーでは関係していないという興味深い結果を得ている(下図)。

IL28B 遺伝子多型と ISG15 mRNA の発現



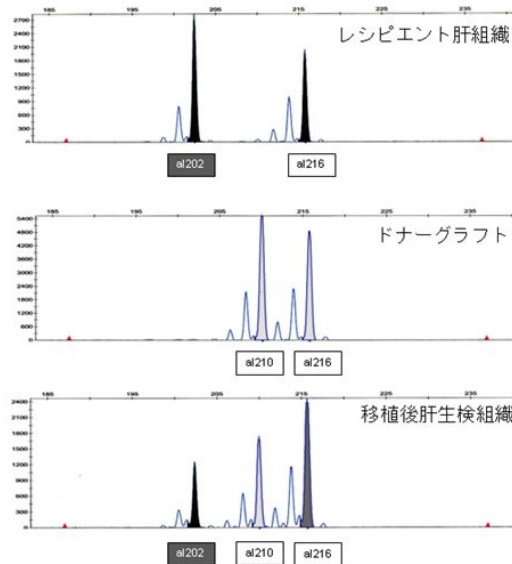
(3)IFN 治療感受性に対する肝組織内のキメリズムの意義の検討

IFN 感受性にはドナー由来の肝細胞もしくはドナー肝組織とともに持ち込まれた樹状細胞を代表とする免疫反応細胞のマイクロキメリズムなどが関わっていることが予想される。HCV 排除機構においてこれらの免疫

反応細胞や肝細胞をはじめとする肝構成細胞がどのように関わっているかを明らかにする目的で、まずマイクロサテライト解析によるグラフト肝組織のキメリズムの検討を行った。移植後肝生検組織ではレシピエントおよびドナー双方から由来した細胞がグラフト肝組織内に存在することがわかる。

肝移植後 Graft Chimerism の検討

Short Tandem Repeat analysis



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 11 件)

1. Konishi H, Motomura T, Matsumoto Y, Harimoto N, Ikegami T, Yoshizumi T, Soejima Y, Shirabe K, Fukuhara T, Maehara Y. Interferon-lambda4 genetic polymorphism is associated with the therapy response for hepatitis C virus recurrence after a living donor liver transplant. *J Viral Hepat.* 2014 Jun;21(6):397-404 doi: 10.1111/jvh.12154. [Epub ahead of print] 査読有
2. Ikegami T, Yoshizumi T, Shirabe K, Maehara Y. Frequent plasma cell hepatitis during telaprevir-based triple therapy for hepatitis C after liver transplantation. *J Hepatol.* 2014 Apr;60(4):894-6. doi: 10.1016/j.jhep.2013.10.037. 査読有
3. Akamatsu N, Sugawara Y, Kokudo N, Eguchi S, Fujiwara T, Ohdan H, Nagano H, Taketomi A, Kitagawa Y, Shimada M, Ku Y, Yanaga K, Shirabe K, Ikegami T, Mizokami M, Takeuchi M, Maehara Y. Outcomes of living donor liver transplantation for HCV-positive recipients in Japan: results of a nationwide survey. *Transpl Int.* 2014 Mar

31. doi: 10.1111/tri.12329. 査読有
4. Konishi H, Shirabe K, Yoshiya S, Ikeda T, Ikegami T, Yoshizumi T, Ikawa-Yoshida A, Motomura T, Fukuhara T, Maehara Y. Hepatic interferon-gamma-induced protein-10 expression is more strongly associated with liver fibrosis than interleukin-28B single nucleotide polymorphisms in hepatocellular carcinoma resected patients with chronic hepatitis C. *Hepatology Res.* 2013 Nov;43(11):1139-47. doi: 10.1111/hepr.12070. 査読有
5. Ikegami T, Shirabe K, Yoshizumi T, Furusyo N, Kotoh K, Kato M, Shimoda S, Soejima Y, Motomura T, Fukuhara T, Maehara Y. Impact of conversion from pegylated interferon- α 2b to interferon- α 2a for treating recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Transplantation.* 2013 Mar 27;95(6):e38-42. doi: 10.1097/TP.0b013e318283a82e. 査読有
6. Morooka Y, Umeshita K, Taketomi A, Shirabe K, Maehara Y, Yamamoto M, Shimamura T, Oshita A, Kanno K, Ohdan H, Kawagishi N, Satomi S, Ogawa K, Hagiwara K, Nagano H. Reliability and validity of a new living liver donor quality of life scale. *Surg Today.* 2013 Jul;43(7):732-40. 査読有
7. Ikegami T, Shirabe K, Yoshizumi T, Aishima S, Taketomi A, Soejima Y, Uchiyama H, Kayashima H, Toshima T, Maehara Y. Primary graft dysfunction after living donor liver transplantation is characterized by delayed functional hyperbilirubinemia. *Am J Transplant.* 2012 Jul;12(7):1886-97. 査読有
8. Yoshizumi T, Shirabe K, Ikegami T, Kayashima H, Yamashita N, Morita K, Masuda T, Hashimoto N, Taketomi A, Soejima Y, Maehara Y. Impact of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 in Living Donor Liver Transplantation. *Am J Transplant.* 2012 Jun;12(6):1479-85. 査読有
9. Soejima Y, Shirabe K, Taketomi A, Yoshizumi T, Uchiyama H, Ikegami T, Ninomiya M, Harada N, Ijichi H, Maehara Y. Left lobe living donor liver transplantation in adults. *Am J Transplant.* 2012 Jul;12(7):1877-85. 査読有
10. Yoshizumi T, Shirabe K, Taketomi A, Uchiyama H, Harada N, Ijichi H, Yoshimatsu M, Ikegami T, Soejima Y, Maehara Y. Risk factors that increase mortality after living donor liver transplantation. *Transplantation.* 2012 Jan 15;93(1):93-8. 査読有
11. Motomura T, Koga E, Taketomi A, Fukuhara T, Mano Y, Muto J, Konishi H,

Toshima T, Uchiyama H, Yoshizumi T, Shirabe K, Maehara Y. Efficacy of splenectomy in preventing anemia in patients with recurrent hepatitis C following liver transplantation is not dependent on inosine triphosphate pyrophosphatase genotype. *Hepatology Res.* 2012 Mar;42(3):288-95. 査読有

6 . 研究組織

(1)研究代表者

武富 紹信 (TAKETOMI AKINOBU)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：70363364

(2)研究分担者

前原 喜彦 (MAEHARA YOSHIHIKO)
九州大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：80165662

研究分担者

調 憲 (SHIRABE KEN)
九州大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：70264025

研究分担者

松浦 善治 (MATSUURA YOSHIHARU)
大阪大学・微生物病研究所・教授
研究者番号：50157252

研究分担者

福原 崇介 (FUKUHARA TAKASUKE)
大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号：70598739

研究分担者

吉住 朋晴 (YOSHIZUMI TOMOHARU)
九州大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：80363373

研究分担者

内山 秀昭 (UCHIYAMA HIDEAKI)
九州大学・大学病院・特任助教
研究者番号：70380425